

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-152984

⑬ Int. Cl.⁴ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 昭和63年(1988)6月25日
C 12 N 15/00 A-8412-4B
C 12 P 21/00 D-6712-4B
21/02 C-6712-4B
//(C 12 P 21/02
C 12 R 1:19) 審査請求 未請求 発明の数 3 (全12頁)

⑮ 発明の名称 抗緑膿菌ヒト型抗体のL鎖をコードするDNA

⑯ 特 願 昭62-64183

⑰ 出 願 昭62(1987)3月20日

優先権主張 ⑱ 昭61(1986)8月18日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 昭61-191687

㉑ 発 明 者 穂 積 豊 治 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社中央研究所内
㉒ 発 明 者 大 下 嘉 弘 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社中央研究所内
㉓ 発 明 者 鈴 木 秀 規 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社中央研究所内
㉔ 出 願 人 湧永製薬株式会社 大阪府大阪市福島区福島3丁目1番39号
㉕ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外5名

明 細 書

1. 発明の名称

抗緑膿菌ヒト型抗体のL鎖をコードする
DNA

2. 特許請求の範囲

1. 抗緑膿菌ヒト型抗体のL鎖をコードするコード領域を含んで成るDNA。

2. 前記コード領域が可変領域をコードするコード領域及び定常領域をコードするコード領域から成る、特許請求の範囲第1項に記載のDNA。

3. 前記定常領域がκタイプ又はλタイプである、特許請求の範囲第2項に記載のDNA。

4. 前記可変領域が緑膿菌F₊タイプを認識する領域である、特許請求の範囲第2項に記載のDNA。

5. 前記可変領域が次のアミノ酸配列:

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Arg Ala Thr
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
Ser Asn Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
Gln Tyr Asp Ala Leu

を有する、特許請求の範囲第4項に記載のDNA。

6. 前記アミノ酸配列が次の塩基配列:

GAA ATT GTT TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC
CTG TCT TTG TCT CCA GGG GGA AGA GCC ACC
CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC
AGC AAT TCC TTA GCC TGG TAC CAA CAG AAA
CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT
GCT GCG TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA
GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG GCA
GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGT AGA CTG GAA
CCT GAA GAT TCT GCA CTG TAT TAC TGT CAG
CAG TAC GAC GCC CTG

によりコードされている特許請求の範囲第5項に記載のDNA。

7. 前記可変領域が緑膿菌本間血清型分類 I 型 (H I タイプ) を認識する領域である、特許請求の範囲第 2 項に記載の DNA。

8. 前記可変領域が次のアミノ酸配列:

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser
Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro
Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Gln Ala
Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

を有する、特許請求の範囲第 7 項に記載の DNA。

9. 前記アミノ酸配列が次の塩基配列:

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA
CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC
ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GAC ATT AGC

Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
Gln Tyr Asp Ala Leu

を有する、特許請求の範囲第 11 項に記載の DNA。

13. 前記アミノ酸配列が次の塩基配列:

GAA ATT GTT TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC
CTG TCT TTG TCT CCA GGG GGA AGA GCC ACC
CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC
AGC AAT TCC TTA GCC TGG TAC CAA CAG AAA
CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT
GCT GCG TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA
GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG GCA
GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGT AGA CTG GAA
CCT GAA GAT TCT GCA GTG TAT TAC TGT CAG
CAG TAC GAC GCC CTG

によりコードされている、特許請求の範囲第 12

AAT TAT TTA GCC TGG TTT CAG CAG AAG CCA
GGG AAA GCC CCC AAG TCC CTG ATC CAG GCT
GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA
AAG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT
GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG
TAT TAT AAT TAC CCT CGG ACT TTT GGC CAG
GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA CGT

によりコードされている特許請求の範囲第 8 項に記載の DNA。

10. 抗緑膿菌ヒト型抗体の L 鎖の可変領域をコードするコード領域を含んで成る DNA。

11. 前記可変領域が緑膿菌 F₄ タイプを認識する領域である特許請求の範囲第 10 項に記載の DNA。

12. 前記可変領域が次のアミノ酸配列:

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Arg Ala Thr
Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
Ser Asn Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

項に記載の DNA。

14. 前記可変領域がグループ III に属する特許請求の範囲第 10 項に記載の DNA。

15. 前記可変領域が緑膿菌本間血清型分類 I 型 (H I タイプ) を認識する領域である特許請求の範囲第 10 項に記載の DNA。

16. 前記可変領域が次のアミノ酸配列:

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser
Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro
Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Gln Ala
Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

を有する、特許請求の範囲第 15 項に記載の DNA。

17. 前記アミノ酸配列が次の塩基配列:

GAG ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA
 CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC
 ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GAC ATT AGC
 AAT TAT TTA GCC TGG TTT CAG CAG AAG CCA
 GGG AAA GCC CCC AAG TCC CTG ATC CAG GCT
 GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA
 AAG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
 TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT
 GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG
 TAT TAT AAT TAC CCT CGG ACT TTT GGC CAG
 GGG ACC AAG CTG CAG ATC AAA CGT

によりコードされている、特許請求の範囲第16項に記載のDNA。

18. 前記可変領域がグループIに属する特許請求の範囲第15項に記載のDNA。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は抗緑膿菌ヒト型モノクローナル抗体のL鎖をコードするDNAコード領域を含んで成る

DNAに関する。

(従来の技術)

シュードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*、以下「緑膿菌」ということがある) は、湿潤な環境には比較的普遍的に存在するグラム陰性桿菌であり、人が健康な状態では何ら問題とならない菌であるが、白血病、広範囲熱傷、慢性呼吸器疾患など人体の感染防御機構に破綻をきたした場合には、しばしば致命的な感染症を引き起こす。

このため、緑膿菌を抑制する医薬として抗生物質を含む種々の化学療法剤が使用されている。しかしながら、緑膿菌は、本来、抗生物質に対して比較的抵抗性があるところから化学療法にも限界があり、今日では化学療法剤の他に抗緑膿菌抗体を患者に投与してやることにより、低下している免疫能を補う方法も行われている。

現在、ヒト型の抗緑膿菌抗体を得る方法としては、緑膿菌感染既往歴のある者の血液から抗血清

を得る方法、及び細胞融合技術 (Nature, 256, 495~497 (1975)) によってモノクローナル抗体を得る方法 (例えば、特開昭59-29622) が提案されている。しかしながら、これらの方法にはそれぞれ難点があるため、これらとは全く異なる方法として、緑膿菌に対する抗体を生産することができるヒト細胞をエプスタインバールウイルス (EBV) によって形質転換して不滅化し、この形質転換体を培養して抗緑膿菌モノクローナル抗体を製造する方法が提案されている (特開昭61-91134号公報)。

しかしながら、この方法においては、抗原に対する特異性を決定する可変領域と抗体のクラス及びサブクラスを決定する定常領域と任意に組合わせた抗体を製造することは困難であり、またこれらの方法によって抗体の任意の断片部分を製造することも困難であった。

(発明が解決しようとする問題点)

しかしながら、緑膿菌に対する抗体を使用して、

緑膿菌感染に対する予防、緑膿菌のタイプの決定等を行おうとする場合、所望の特異性を有する種々のクラス又はサブクラスの抗体を得、あるいは所望の特異性を有する種々の抗体断片を得るのが有利である。このような任意の種類の抗体又は抗体断片を得るには遺伝子組換技法を用いるのが便利である。

従って、本発明は、遺伝子組換技法により緑膿菌に対する抗体を製造する前提として、緑膿菌に対する抗体のL鎖をコードするコード領域を含んで成るDNA、及び該L鎖の可変領域をコード領域を含んで成るコードするDNAを提供しようとするものである。

(問題点を解決するための手段)

前記の目的は、抗緑膿菌抗体のL鎖をコードするDNAをコードする領域を含んで成るDNA、及び該L鎖の可変領域をコードするDNAを提供することにより解決される。

(具体的な説明)

本発明のDNAは抗緑膿菌抗体のL鎖(軽鎖)の変換領域をコードするコード領域及び定常領域(C領域)をコードするコード領域(C-コード領域)を含んで成る。前記可変領域をコードするコード領域は、V-コード領域、J-コード領域からなり、そして特定の特異性を示すアミノ酸配列をコードするように再構成(VJ再構成)が完成していなければならない。再構成されたこのDNA領域を本発明においてはVJ-コード領域と称する。しかしながら、このVJ-コード領域とC-コード領域とは一体化していてもよく、また両者間に非コード領域が介在していてもよい。前者のDNAはm-RNAに由来するcDNAとして調製することができ、他方後者のDNAは所望の抗体を産生する細胞のゲノムDNAから得ることができる。

本発明のDNAの1つの具体例においては、第2図に示すようにVJ-コード領域とC-コード領域との間に非コード領域が介在している。

Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser
Ser Asn Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
Ala Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ala
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
Gln Tyr Asp Ala Leu

また、本発明のDNAの1例のVJ-コード領域によりコードされるアミノ酸配列は、本間血清分類I型(HI)に対する抗体においては、塩基配列から次のように推定される。

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser
Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro
Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Gln Ala
Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

VJ-コード領域は緑膿菌のいずれかのタイプ、例えばフィシャータイプF₁、～F₁₀、又は本間タイプH₁、～H₁₀のいずれかに対して特異的な可変領域をコードするDNA領域である。本発明においては、フィシャータイプF₁、及び本間血清分類I型(HI)に対する抗体をコードするDNAを例にとって具体的に説明する。

C-コード領域はκ鎖をコードする領域(Cκ-コード領域)、又はλ鎖をコードする領域(Cλ-コード領域)のいずれかである。本発明においては具体例としてCκ-コード領域を有するDNAを例にとって具体的に説明する。

C-コード領域の構造はすでに種々検討され解明されている。

本発明のDNAの1例のVJ-コード領域によりコードされるアミノ酸配列は、フィッシャータイプF₁に対する抗体においては、塩基配列から次のように推定される。

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Arg Ala Thr

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

ただし、上記記号は当業界でアミノ酸の略号として認証されているものであって、各々、

Asn: アスパラギン、 Ser: セリン
Asp: アスパラギン酸、 Glu: グルタミン酸
Cys: システイン、 Pro: プロリン
Leu: ロイシン、 His: ヒスチジン
Gly: グリシン、 Tyr: チロシン
Val: バリン、 Met: メチオニン
Ile: イソロイシン、 Ala: アラニン
Lys: リジン、 Gln: グルタミン
Arg: アルギニン、 Trp: トリプトファン
Phe: フェニルアラニンを示す。

また、この領域の塩基配列は、フィッシャータイプF₁に対する抗体については、次のように決定された。

GAA ATT GTT TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC
CTG TCT TTG TCT CCA GGG GGA AGA GCC ACC

CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC
 AGC AAT TCC TTA GCC TGG TAC CAA CAG AAA
 CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT
 GCT GCG TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA
 GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG GCA
 GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGT AGA CTG GAA
 CCT GAA GAT TCT GCA GTG TAT TAC TGT CAG
 CAG TAC GAC GCC CTG

他方、本間血清分類 I 型 (H I) に対する抗体については、次の様に決定された。

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA
 CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC
 ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GAC ATT AGC
 AAT TAT TTA GCC TGG TTT CAG CAG AAG CCA
 GGG AAA GCC CCC AAG TCC CTG ATC CAG GCT
 GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA
 AAG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
 TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT
 GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG
 TAT TAT AAT TAC CCT CGG ACT TTT GGC CAG

るゲノム DNA 挿入部を含むプラスミドを選択することができる。

他の方法においては、所望の抗体を産生する細胞から RNA を抽出し、この抽出物をオリゴ d T カラムで処理することによりポリ A (') RNA を濃縮する。次に、常法に従って、このポリ A (') RNA を鋳型として、これに相補的な第一の c DNA を合成し、次に鋳型 RNA を分解除去した後前記第一の c DNA を鋳型として第二の c DNA を合成し、2 本鎖 c DNA を含有するプラスミドを得る。このプラスミドにより、例えば大腸菌を形質転換することによって遺伝子ライブラリーを作成する。次に、前記の様にこのライブラリーをスクリーニングすることにより所望の c DNA 挿入部を含有するプラスミドを選択することができる。

(発明の効果)

本発明により、抗緑膿菌ヒト型抗体の L 鎖をコードする DNA が提供される。この DNA は抗緑

GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA CGT

本発明の DNA は、所望の抗体を産生する細胞からゲノム DNA を抽出し、これを制限酵素、剪断力等常用の手段により切断し、これを常法に従ってクローニング用ベクター、例えばプラスミド pBR322, pBR325, pUC13 等に挿入し、これらのプラスミドにより常用の宿主、例えば大腸菌の形質転換して遺伝子ライブラリーを造成する。次に、このライブラリーを、常用の手段、例えばコロニーハイブリダイゼーションによりスクリーニングする。この場合、C-コード領域は、同一のタイプでは共通する塩基配列を含んでいるので、すでにクローニングされている C-コード領域 DNA を、例えば³²P により標識してプローブとして使用することができる。また、すでに知られている配列を有するオリゴヌクレオチドを合成してこれを用いることもできる。例えば、選択しようとする DNA が x タイプの抗体を産生するヒト細胞に由来する場合には、³²P 標識化ヒト C x 遺伝子を使用することにより、C x-コード領域を含有す

菌ヒト型抗体の H 鎖をコードする DNA と組み合わせることによって、抗緑膿菌ヒト型抗体を製造するために使用することができる。

また、本発明の DNA の C-コード領域を除去した後 V J-コード領域を他のタイプの C-コード領域と連結して、これを発現せしめることにより特定の特異性を有する任意のタイプの L 鎖を調製することができ、さらに、同様に操作した H 鎖と共に使用することにより、特定の特異性を有する任意のクラス及びサブクラスの抗体を製造することができる。

さらには、本発明の DNA を切断して所望の DNA 部分のみを発現せしめることにより、任意の抗体断片を得ることができる。

次に実施例により、この発明をさらに具体的に説明する。

実施例 1.

(1) 染色体 DNA の単離

特開昭61-91134号公報に開示された方法に従って緑膿菌 F₀ に対するモノクローナル抗体産生細

胞G3-1 (IgG₂/κ)を得た。

G3-1細胞 1×10^8 個を10mlの緩衝液中(0.5M EDTA(pH8.0)、100μg/ml プロテアーゼK(ベーリンガー・マンハイム社)、0.5%サルコシルで50℃にて3時間処理した後、等量の水飽和フェノールを加えた。ついで遠心

(8000×g、10分間)により水相を分離し、これを50mMトリス塩酸緩衝液(Tris-HCl)

(pH8.0)、10mM EDTA、10mM NaClに対して透析した。これに加熱処理したリボヌクレアーゼA(ベーリンガー・マンハイム社)を終濃度が100μg/mlになるように加え、37℃で3時間処理したのち、再度上記と同様にフェノール抽出、透析を行って712μg/mlの染色体DNA(G3-1 DNA)を得た。

(2) L鎖DNAの検出

上記G3-1 DNA 10μgを、制限酵素EcoRI、又はBamHI(ニッポンジーン社)のいずれかを用いて37℃で2時間消化を行った。消化後、0.8%アガロースゲル電気泳動を行い

示し、EcoRIおよびBamHIは、この制限酵素を用いて消化したことを意味する。この結果よりEcoRI及びBamHIで消化したDNA遺伝子については各々、約2.5 kbp および8.5 kbp にバンドが確認できた。なお、VJ再構成していない場合の染色体DNAはBamHI消化によれば約10 kbp にバンドを与えることが知られている(The Journal of Biological Chemistry, 257, 1516-1522(1982))。従って、BamHI処理により得られた8.5 kbpのDNA断片は再構成されたVJコード領域及びCコード領域を含むL鎖コード領域を含有するDNA断片であることが確認された。

実施例2.

(1) 遺伝子ライブラリーの調製

G3-1 DNA 20μgをBamHIで消化したのち、10-40%ショ糖密度勾配遠心(日立RPS-40T, 35krpm, 14時間)によりサイズ分画を行った。ついでアガロースゲル電気泳動およびDNAドットハイブリダイゼーションによって目的と

DNA断片を分離した。ついでここで得られたゲルを0.25N HClで15分間、0.5N NaOH-1.5M NaClで30分間、0.5M Tris-HCl(pH7.4)-1.5M NaClで30分間処理した。ついで20×SSC(0.3Mクエン酸ナトリウム、3M NaCl)を用い、ニトロセルロースフィルター(S&S社)へDNAをトランスファーした。

一方、染色体DNA上のヒトκ鎖の定常領域(Cκ)をコードするコード領域については、塩基配列および制限酵素EcoRIで消化した場合、約2.5 kbpの断片にCκコード領域が含まれていることが知られている(Cell, 22, 197-207(1980))。従って、このCκコード領域を含むEcoRI消化DNA断片を得、2.5 kbp断片0.5μgをプローブとして使用するためにニックトランスレーションキット(BRL社)で³²P標識化した。

そして、これと上記フィルターとのサザンハイブリダイゼーションを行った。このときの結果を第1図に示す。同図中、数値は、塩基対の長さを

するDNA断片(BamHI消化した7~9 kbp断片)を回収した(4μg/ml)。

他方、プラスミドpUC13(ファルマシア社から市販されている)をBamHIで消化し、アルカリ性ホスファターゼで処理して線状プラスミドを調製した。

次に、これと、上記DNA断片との反応をT4 DNAリガーゼ(宝酒造)を用い、4℃、一晩行い、得られた組換えDNAを用いて大腸菌K12C600(PERM BP-115)の形質転換を行ってG3-1遺伝子ライブラリー(3×10^8 CFU/μg DNA)を作成した。

(2) L鎖DNAのスクリーニング

形質転換された上記大腸菌 5×10^6 個をコロニーハイブリダイゼーション法(成書Molecular Cloning A Laboratory Manual)に従って、前記の³²P標識化ヒトCκ遺伝子をプローブとして用いて、L鎖をコードするDNA断片が挿入されたプラスミドを選択し、このプラスミドをpG31VKと命名した。

実施例3. 発現用組換え体pG31VK-gptの調製

pSV2-gpt (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 2072 (1981); ボールバーク氏より入手) を BamHI で消化した断片と、pG31VKを BamHI で消化した断片とを常法に従って連結し、*L* 鎖遺伝子を含むプラスミドpG31VK-gptを得た。そしてこのプラスミドは実施例1と同様な方法で*L* 鎖遺伝子が入っていることを確認した。このプラスミドを含有する大腸菌エシェリシャ・コリ (*Escherichia coli*) K12C600 (pG31VK-gpt) は工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌第8905号 (FERM P-8905) として寄託されている。

実施例4. 制限酵素切断点地図の作成

上記プラスミドpG31VKを制限酵素 *EcoRI*, *BamHI* および *Hind III* (ニッポンジーン社) で消化し、切断パターンの解析を行った。また、可変領域 (VJ) を含む *Hind III* 断片 (約2.9 kb) をプラスミドpUC13 (ファルマシア社) の *Hind III* サイトへクローニングした (以下ここで得られたプラスミドはpG31VK-H2とする)。pG31VK-H2を

制限酵素 *Sst I*, *Pst I*, 又は *Nco I* (ニッポンジーン社) で消化し、制限酵素切断点地図を作成した。そのときの結果を第2図に示す。この図中、VJは可変領域をコードするコード領域を示し、Cκは定常領域をコードするコード領域を示す。最上段の数値はDNA断片の長さを示す。

この図から明らかな様に、このDNA断片は完全なVJコード領域及びCκコード領域を含んで成る。

実施例5.(1) 塩基配列の決定

pG31VK-H2を制限酵素 *Pst I* で消化して得られる断片を、プラスミドpUC13の *Pst I* 部位へリクローニングした。このリクローニングで得られるプラスミドの制限酵素 *BamHI* および *Hind III* 部位、またpG31VK-H2の制限酵素 *Nco I* 部位を³²P標識したのち、マキサム・ギルバート法 (Methods in Enzymology, 65, 499-560 (1980)) により、塩基配列の決定を行った。

(2) データの解析

塩基配列決定の結果を第3図に示す。第3-1図及び3-2図はVJ-コード領域及びその近傍の塩基配列を示す。この配列は5'非コード領域、リーダー配列 (Lで示す)、V-コード領域 (Vで示す)、J-コード領域 (Jで示す)、及びそれに続く3'非コード領域を含む。

塩基配列下段の一字のアルファベットは、アミノ酸の略号であって下記を意味する。

N : Asn	S : Ser
D : Asp	E : Glu
C : Cys	P : Pro
L : Leu	H : His
G : Gly	Y : Tyr
V : Val	M : Met
I : Ile	A : Ala
K : Lys	Q : Gln
R : Arg	W : Trp
F : Phe	

また、アミノ酸配列中、二重下線を付された部

分は、抗原の結合に必要とされる領域である。

ヒト免疫グロブリンK鎖のV領域は、大きく4つのサブグループに分類されている (たとえば、日本生化学会編、生化学データブックⅡ p1022)。そして、本発明により決定された領域は、サブグループⅢに属することが示唆される。そして塩基配列の下段のアルファベット中□で囲んでいるものは、サブグループⅢに特徴的なアミノ酸である。なお、塩基配列の上には塩基Mを示しており、

821位のSerは、本来のサブグループⅢではPheであること以外は全てサブグループⅢと同一である。

実施例6.(1) 染色体DNAの単離

特開昭61-91134号公報に開示された方法に従って緑膿菌本菌血清分類I型 (H1) に対するモノクローナル抗体産生細胞H7-2 (IgG₂/κ) を得た。

H7-2細胞1×10⁸個を10mlの緩衝液中 (0.5 M EDTA (pH 8.0)、100 μg/ml プロ

テアーゼK (ベーリンガー・マンハイム社)、0.5 %サルコシルで50℃にて3時間処理した後、等量の水飽和フェノールを加えた。ついで遠心 (8000×g、10分間) により水相を分離し、これを50 mM トリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl) (pH 8.0)、10 mM EDTA、10 mM NaCl に対して透析した。これに加熱処理したリボスクレアーゼA (ベーリンガー・マンハイム社) を終濃度が100 μg/ml になるように加え、37℃で3時間処理したのち、再度上記と同様にフェノール抽出、透析を行って710 μg/ml の染色体DNA (H7-2 DNA) を得た。

(2) L鎖DNAの検出

上記H7-2 DNA 10 μgを、制限酵素EcoRI、又はBamHI (ニッポンジーン社) のいずれかを用いて37℃で2時間消化を行った。消化後、0.8 %アガロースゲル電気泳動を行いDNA断片を分離した。ついでここで得られたゲルを0.25 N HCl で15分間、0.5 N NaOH - 1.5 M NaCl で30分間、0.5 M Tris-HCl (pH 7.4)

- 1.5 M NaCl で30分間処理した。ついで20×SSC (0.3 M クエン酸ナトリウム、3 M NaCl) を用い、ニトロセルロースフィルター

(S & S社) へDNAをトランスファーした。

一方、染色体DNA上のヒトκ鎖の定常領域(Cκ)をコードするコード領域については、塩基配列および制限酵素EcoRIで消化した場合、約2.5 kbの断片にCκコード領域が含まれていることが知られている (Cell, 22, 197-207 (1980))。従って、このCκコード領域を含むEcoRI消化DNA断片を得、2.5 kb断片0.5 μgをプローブとして使用するためにニックトランスレーションキット (BRL社) で³²P標識化した。

そして、これと上記フィルターとのサザンハイブリダイゼーションを行った。このときの結果を第4図に示す。同図中、数値は、塩基対の長さを示し、EcoRIおよびBamHIは、この制限酵素を用いて消化したことを意味する。この結果よりEcoRI及びBamHIで消化したDNA遺伝子に

ついては各々、約2.5 kbp および8.5 kbp にバンドが確認できた。なお、VJ再構成していない場合の染色体DNAはBamHI消化によれば約10 kbp にバンドを与えることが知られている (The Journal of Biological Chemistry, 257, 1516-1522 (1982))。従って、BamHI処理により得られた8.5 kbのDNA断片は再構成されたVJ-コード領域及びC-コード領域を含むL鎖コード領域を含有するDNA断片であることが確認された。

実施例7.

(1) 遺伝子ライブラリーの調製

H7-2 DNA 10 μgをBamHIで消化したのち、0.8 %アガロースゲル電気泳動を行い、目的とするDNA画分 (BamHIで消化した7~9 kb断片) を回収した (1.1 μg/ml)。

他方、プラスミドpUC13 (ファルマシア社から市販されている) をBamHIで消化し、アルカリ性ホスファクターゼで処理して線状プラスミドを調製した。

次に、これと、上記DNA画分との反応をT4 DNAリガーゼ (宝酒造) を用い、4℃、一晩行い、得られた組換えDNAを用いて大腸菌K12C600 (FERM BP-115) の形質転換を行ってH7-2遺伝子ライブラリー (2.5 × 10⁵ CFU/μg DNA) を作成した。

(2) L鎖DNAのスクリーニング

形質転換された上記大腸菌5 × 10⁴ 個をコロニーハイブリダイゼーション法 (成書Molecular Cloning A Laboratory Manual) に従って、前記の³²P標識化ヒトCκ遺伝子をプローブとして用いて、L鎖をコードするDNA断片が挿入されたプラスミドを選択し、このプラスミドをpH7232Lと命名した。

実施例8. 発現用組換え体pH7232L-neoの調製

pSV2-neo (J. Mol. Appl. Genet., 1, 327 (1982): ポールバーグ氏より入手) をBamHIで消化した断片と、pH7232LをBamHIで消化した断片とを常法に従って連結し、L鎖遺伝子を含むプラスミドpH7232L-neoを得た。そしてこのプラスミドは

実施例1と同様な方法でL鎖遺伝子が入っていることを確認した。このプラスミドを含有する大腸菌エシリシャ・コリ (*Escherichia Coli*) K12C600 (pH7232L-neo) は工業技術院微生物工業技術研究所に微生物菌第9286号 (FERM P-9286) として寄託されている。

実施例9. 制限酵素切断点地図の作成

上記プラスミドpH7232Lを制限酵素EcoRI, BamHIおよびHindIII (ニッポンジーン社) で消化し、切断パターンの解析を行った。また、可変領域 (VJ) を含むHindIII断片 (約2.9kb) をプラスミドpUC13 (ファルマシア社) のHindIIIサイトへクローニングした (以下ここで得られたプラスミドはpH7232L-6とする)。pH7232L-6を制限酵素SstI、PstI、BstEII又はNcoI (ニッポンジーン社) で消化し、制限酵素切断点地図を作成した。そのときの結果を第5図に示す。この図中、VJは可変領域をコードするコード領域を示し、Cxは定常領域をコードするコード領域を示す。最上段の数値はDNA断片の長さを示

す。

この図から明らかな様に、このDNA断片は完全なVJコード領域及びCxコード領域を含んで成る。

実施例10.

(1) 塩基配列の決定

pH7232L-6を制限酵素PstIで消化して得られる断片を、プラスミドpUC13のPstI部位へリクローニングした。このリクローニングで得られるプラスミドの制限酵素BamHIおよびHindIII部位、またpH7232L-6の制限酵素NcoI部位を³²P標識したのち、マキサム・ギルバート法 (Methods in Enzymology, 65, 499-560 (1980)) により、塩基配列の決定を行った。

(2) データの解析

塩基配列決定の結果を第6図に示す。この配列は5'非コード領域、リーダー配列、V-コード領域、J-コード領域、及びそれに続く3'-非コード領域を含む。

第6図中の記号は第3図中のそれと同じ意味を

有する。

このアミノ酸配列よりこの可変領域は日本生化学会誌、生化学データブックII pp1022やE.A.Kabat等の編集したSequence of Proteins of Immunological Interest (1983) (National Institutes of Health, Bethesda) よりグループIに属する。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、フィッシャータイプF₄に対する抗体をコードする遺伝子のスクリーニングにおけるサザンハイブリダイゼーションのオートラジオグラム結果を示す。

第2図は、フィッシャータイプF₄に対する抗体のL鎖をコードするDNAを含むDNA断片の制限酵素切断地図を示す。

第3-1図及び第3-2図は、フィッシャータイプF₄に対する抗体の可変領域をコードするDNA及びその近傍の塩基配列を示す。

第4図は、本間血清分類I型 (HI) に対する抗体をコードする遺伝子のスクリーニングにおけるサザンハイブリダイゼーションのオートラジオ

グラム結果を示す。

第5図は、本間血清分類I型 (HI) に対する抗体のL鎖をコードするDNAを含むDNA断片の制限酵素切断地図を示す。

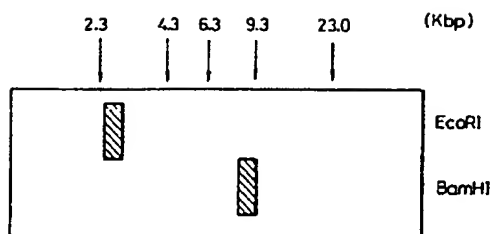
第6図は、本間血清分類I型 (HI) に対する抗体の可変領域をコードするDNA及びその近傍の塩基配列を示す。

特許出願人

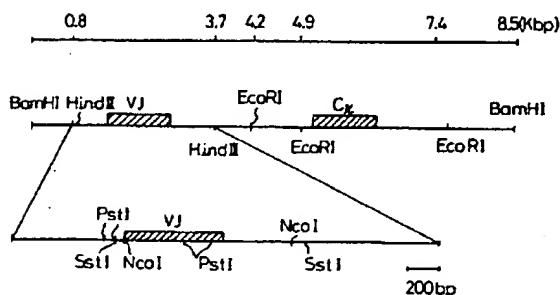
湧永製薬株式会社

特許出願代理人

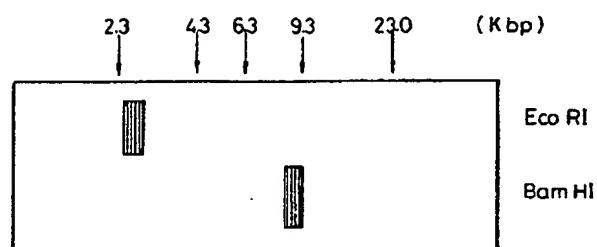
弁理士	青	木	明
弁理士	西	館	和之
弁理士	石	田	敬
弁理士	福	本	信
弁理士	山	口	昭之
弁理士	西	山	雅也



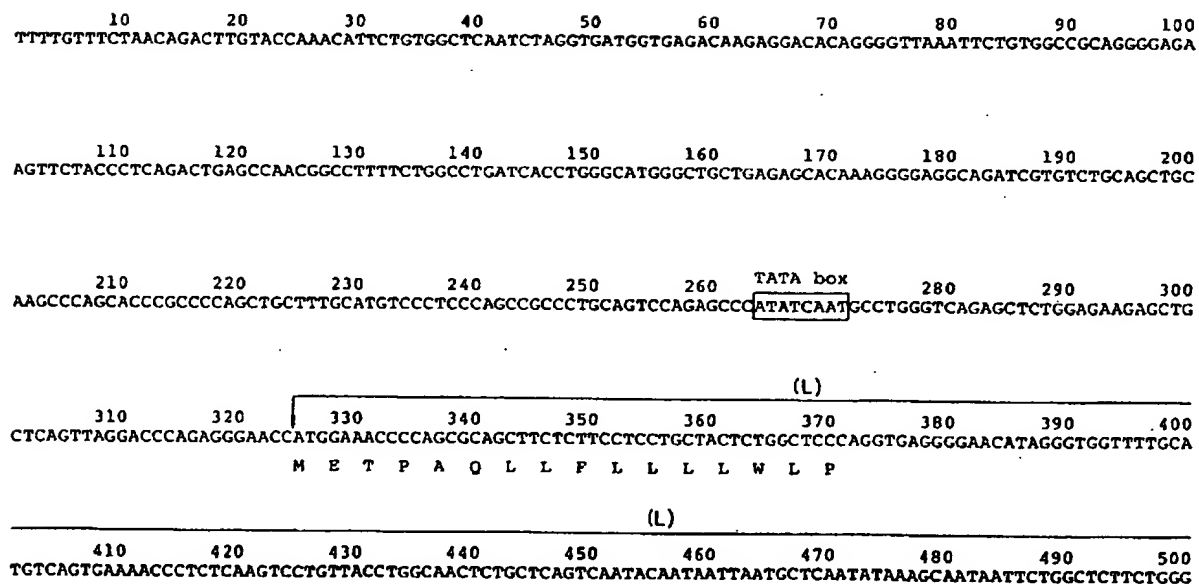
第 1 図



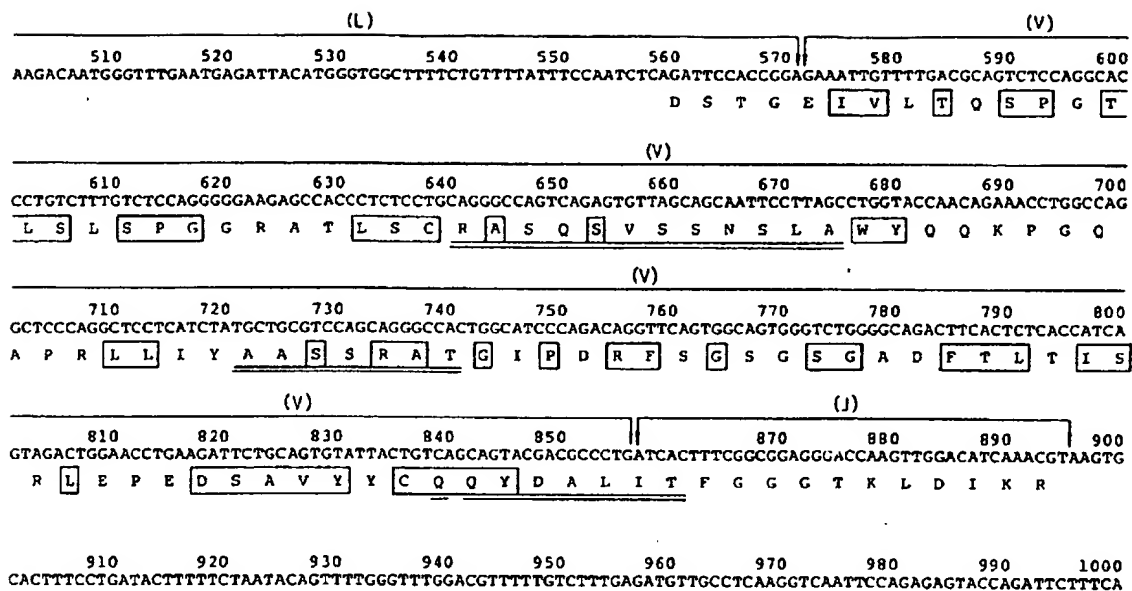
第 2 図



第 4 図

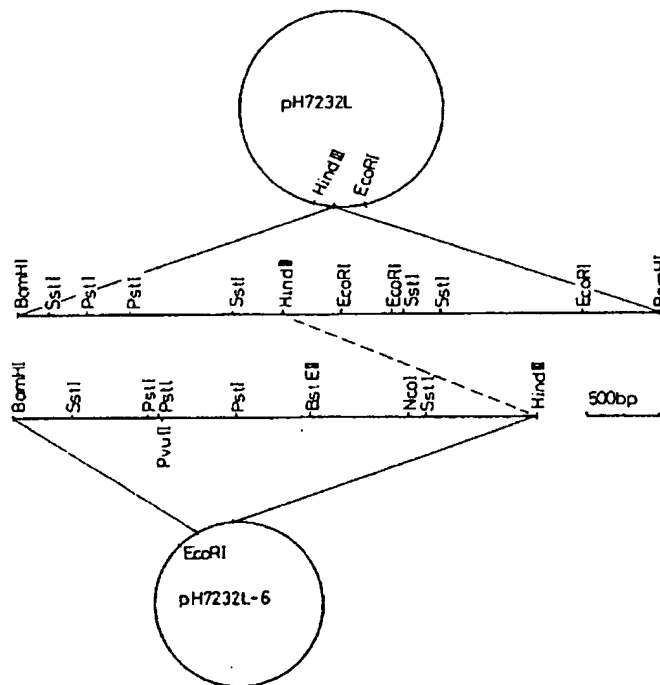


第 3-1 図



1010
 AAAAGTCAAGC

第 3-2 図



第 5 図

CTGCAGCTGTGCCCAGCCTGCCCCATCCCTGCTCATTTCATGTTCCAGAGCACAACTCCTGCCCTCAAGCCTTATT

AATAGGCTGGTCAGACTTTGTGCAGGAATCAGACCCAGTCAGGACACAGCATGGACATGAGAGTCCTCGCTCAGCTCCTG
M R V L A Q L L

GGGCTCCTGCTGCTCTGTTTCCAGGTAAGGATGGAGAACACTAGCAGTTTACTCAGCCCAGGGTGCTCAGTACTGCTT
G L L L L C F P G

ACTATTCAAGGACATCTCTACAACATGATTAATTGTGTGGACATCTGTTTTATGTTTCCAATCTCAGGTGCCAGATGTG
A R C D

ACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGCTGTCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTGCGGCGAGTCAG
I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q

GACATTAGCAATTATTTAGCCTGGTTTCAGCAGAAGCCAGGGAAAGCCCCAAGTCCCTGATCCAGGCTGCATCCAGTTT
D I S N Y L A W P Q Q K P G K A P K S L I Q A A S S L

GCAAAGTGGGGTCCCATCAAAGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTG
Q S G V P S K F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E

AAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATTATAATTACCTCGGACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA
D F A T Y Y C Q Q Y Y N Y P R T F G Q G T K L E I K

CGTAAGTACTTTTTTCCACTGATTCTTCACT
R

第 6 図